



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Patentschrift
⑩ DE 197 54 978 C 2

⑤1 Int. Cl.⁷:
G 01 N 27/62
B 01 L 3/00
G 01 N 1/28
G 01 N 33/48
B 01 L 3/02
H 01 J 49/02

⑳ Aktenzeichen: 197 54 978.0-52
㉔ Anmeldetag: 11. 12. 1997
㉕ Offenlegungstag: 1. 7. 1999
㉖ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 13. 7. 2000

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

㉗ Patentinhaber:
Bruker Daltonik GmbH, 28359 Bremen, DE

㉘ Erfinder:
Schürenberg, Martin, 27412 Tarmstedt, DE;
Franzen, Jochen, 28359 Bremen, DE

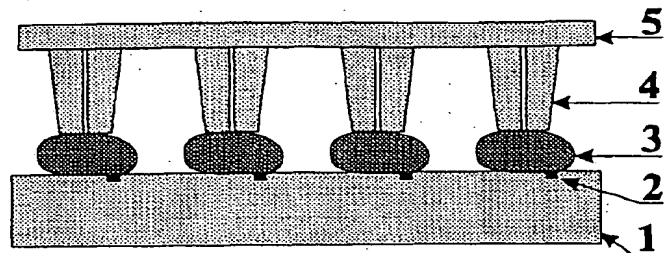
⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

DE 196 28 178 C1
DE 196 18 032 A1
DE 196 17 011 A1

J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1994, 5, S. 955-958;
45th ASMS Conference on Mass Spectrometry and
Allied Topics, Palm Springs, 2.-5. Juni 1997;
Daniel P. LITTLE et al.: MALDI on a Chip: Analy-
sis of Arrays of sub - to low - nL DNA Samples;

⑤4 Probenträger für die MALDI-Massenspektrometrie nebst Verfahren zur Herstellung der Platten und zum
Aufbringen der Proben

⑤7 Die Erfindung betrifft Probenträger für die massen-
spektrometrische Analyse von Biomolekülen, Verfahren
zur Herstellung der Probenträger und Verfahren zum Be-
laden der Probenträger mit Proben der Biomoleküle aus
vorwiegend wäßrigen Lösungen zusammen mit Matrix-
substanz für die Ionisierung der Substanzen durch matrix-
unterstützte Laserdesorption (MALDI).
Die Erfindung besteht darin, die Oberfläche der Proben-
träger stark flüssigkeitsabweisend (hydrophob) zu ma-
chen, wodurch beim Eintrocknen der Probentröpfchen zu
Probenflecken eine Struktur der MALDI-Matrixkristalle er-
zwungen wird, die für eine effektive Ionisierung günstig
ist. Durch winzige, benetzungsfreundliche (hydrophile)
Ankerbereiche für die Probentröpfchen in dieser hydro-
phoben Umgebung wird der Pipettiervorgang sehr er-
leichtert und es können die Probenflecke auf dem Proben-
träger sehr genau lokalisiert werden. Beim Aufpipettieren
von Probentröpfchen ziehen sich diese auch bei leicht un-
genauer Auftragung auf die hydrophilen Ankerbereiche
zurück und trocknen dort unter Bildung eines monoliti-
schen Kristallkonglomerats ein, das günstige Eigenschaf-
ten für den MALDI-Prozeß besitzt. Das Verfahren kann ins-
besondere für die Oligonukleotid-Analyse mit 3-Hydrox-
ypicolinsäure (3-HPA) als Matrix, aber auch für andere
MALDI-Präparationslösungen von Biomolekülen verwen-
det werden.



DE 197 54 978 C 2

DE 197 54 978 C 2

Die Erfindung betrifft Probenträger für die massenspektrometrische Analyse von Biomolekülen, Verfahren zur Herstellung der Probenträger und Verfahren zum Beladen der Probenträger mit Proben der Biomoleküle aus vorwiegend wäßrigen Lösungen zusammen mit Matrixsubstanz für die Ionisierung der Substanzen durch matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI).

Die Erfindung besteht darin, die Oberfläche der Probenträger stark flüssigkeitsabweisend (hydrophob) zu machen, wodurch beim Eintrocknen der Probentropfen zu Probenflecken eine Struktur der MALDI-Matrixkristalle erzwingen wird, die für eine effektive Ionisierung günstig ist. Durch winzige, benetzungsfreundliche (hydrophile) Ankerbereiche für die Probentropfen in dieser hydrophoben Umgebung wird der Pipettiervorgang sehr erleichtert und es können die Probenflecke auf der Probenträger sehr genau lokalisiert werden. Beim Aufpipettieren von Probentropfen ziehen sich diese auch bei leicht ungenauer Auftragung auf die hydrophilen Ankerbereiche zurück und trocknen dort unter Bildung eines monolithischen Kristallkonglomerats ein, das günstige Eigenschaften für den MALDI-Prozess besitzt. Das Verfahren kann insbesondere für die Oligonukleotid-Analyse mit 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) als Matrix, aber auch für andere MALDI-Präparationslösungen von Biomolekülen verwendet werden.

Stand der Technik

Für die Analyse von Biomolekülen hat sich die Massenspektrometrie mit Ionisierung durch matrix-unterstützte Laserdesorption und Ionisierung (MALDI) als ein Standardverfahren etabliert. Meist werden dazu Flugzeitmassenspektrometer (TOF-MS = time-of-flight mass spectrometer) verwendet, aber auch Ionenzyklotron-Resonanzspektrometer (FT-ICR = Fourier-transform ion cyclotron resonance) oder Hochfrequenz-Quadrupol-Ionenfallenmassenspektrometer können hier eingesetzt werden. Die Biomoleküle befinden sich in aller Regel in wäßriger Lösung. Im folgenden werden die Biosubstanzen, deren Moleküle untersucht werden sollen, auch "Analyt" genannt.

Unter Biomolekülen sollen hier besonders die Oligonukleotide (also das Genmaterial in seinen verschiedenen Ausformungen wie DNA oder RNA) und Proteine (also die wesentlichen Bausteine der lebenden Welt) verstanden werden, einschließlich ihrer besonderen Analoge und Konjugate, wie beispielsweise Glycoproteine oder Lipoproteine.

Die Auswahl der Matrixsubstanz für MALDI hängt von der Art der Biomoleküle ab; es sind inzwischen weit über hundert verschiedene Matrixsubstanzen bekannt geworden. Die Matrixsubstanz hat unter anderem die Aufgabe, die Probenmoleküle möglichst einzeln festzuhalten, am Probenträger anzubinden, während des Laserschusses durch Bildung einer Dampfzelle ohne Zerstörung der Biomoleküle und möglichst ohne Anlagerung der Matrixmoleküle in die Gasphase zu übertragen, und schließlich dort unter Protonierung oder Deprotonierung zu ionisieren. Für diese Aufgabe hat es sich als günstig erwiesen, die Analytmoleküle in irgendeiner Art in die zumeist kristallinen Matrices bei deren Kristallisation oder zumindest in die Grenzflächen zwischen den Kriställchen einzubauen.

Für das Auftragen von Probe und Matrix sind eine Reihe verschiedener Methoden bekannt geworden. Die einfachste davon ist das Aufpipettieren einer Lösung mit Probe und Matrix auf einen gereinigten, metallischen Probenträger. Der Lösungstropfen bildet auf der Metalloberfläche eine Benetzungsfläche, deren Größe in etwa dem Tropfendurchmes-

ser entspricht und von der Hydrophilität der Metalloberfläche und den Eigenschaften des Tröpfchens abhängt. Es bildet sich dabei nach dem Auftrocknen der Lösung ein Probenfleck aus kleinen Matrixkriställchen in der Größe dieser Benetzungsfläche, wobei sich in der Regel aber keine gleichmäßige Belegung der Benetzungsfläche zeigt. Die Kriställchen der Matrix beginnen in wäßrigen Lösungen in der Regel am Rand der Benetzung der Metallplatte mit dem Probentropfen zu wachsen. Sie wachsen zum Inneren der Benetzungsfläche hin. Häufig bilden sie strahlenartige Kristalle, wie zum Beispiel bei 5-Dihydroxybenzoesäure oder 3-Hydroxypicolinsäure, die sich zum Inneren des Flecks hin von der Trägerplatte abheben. Das Zentrum des Flecks ist häufig leer oder mit feinen Kriställchen bedeckt, die aber wegen ihrer hohen Konzentration an Alkalisalzen kaum für die MALDI-Ionisierung brauchbar sind. Die Beladung mit Analytmolekülen ist sehr ungleichmäßig. Diese Belegungsart erfordert daher eine visuelle Betrachtung der Probenträgeroberfläche durch ein Videomikroskop, das an allen kommerziell hergestellten Massenspektrometern für diese Art von Analysen zu finden ist. Ionenausbeute und Massenauflösung schwanken im Probenfleck von Ort zu Ort. Es ist oft ein mühsamer Vorgang, eine günstige Stelle des Probenflecks mit guter Analytionenbeute und guter Massenauflösung zu finden, und nur Erfahrung und Ausprobieren hilft hier bisher weiter.

Für Matrixsubstanzen, die sich nur sehr schwer oder gar nicht in Wasser lösen, wie beispielsweise α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure, hat es sich als günstig erwiesen, eine sehr dünne Schicht der Kristalle auf der Oberfläche vor dem Aufbringen der wäßrigen Analytlösungen zu erzeugen, beispielsweise durch Aufbringen einer Lösung der Matrixsubstanz in Azeton. Diese Art der MALDI-Belegung ist bei Peptiden sehr erfolgreich (O. Vorm et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom., 5, (1994), 955). Die Belegung zeigt insbesondere eine ortsunabhängige Empfindlichkeit im Probenfleck, eine Grundvoraussetzung für jede automatisch auszuführende Analyse. Leider kann man diese Art der homogenen Präparation für wasserlösliche Matrices nicht anwenden, beispielsweise nicht für Oligonukleotide, für die sich bisher 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) in wäßriger Lösung als günstigste Matrix erwiesen hat. Diese Matrix zeigt aber die oben beschriebenen Randeefekte in extremer Weise.

Für Oligonukleotide ist eine günstige Methode des Probenauftrags bekannt geworden, die jedoch auf Siliziumchips beschränkt ist. Die an der Oberfläche des Chips gebundenen Oligonukleotide werden mit einer piezobetriebenen Mikropipette mit Mikrotropfen einer Matrixlösung (3-HPA) von nur einigen Hundert Picolitern beschossen, wodurch eine Kristallstruktur mit gleichmäßiger MALDI-Empfindlichkeit erzeugt wird (D. Little et al., Vortrag auf der 45. ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Palm Springs, 2. bis 5. Juni 1997).

Wie in Patent DE 196 28 178 C1 beschrieben, kann man in Pipettenrobotern auf einem Probenträger viele Probenflecken in hoher Dichte mit Hilfe von Vielfachpipetten durch mehrmaligen Übertrag der Proben aus Mikrotiterplatten auftragen. Dabei hängt aber die Ortsgenauigkeit der Probenflecken von der Präzision des Probenroboters ab. Die kommerziell erhältlichen Probenroboter haben aber nur eine mechanische Präzision von bestenfalls 200 Mikrometern. Diese Auftragung führt ohne besondere Präparationstechnik zu den oben beschriebenen unregelmäßigen Probenflecken.

Auch die in den Patentanmeldungen DE 196 17 011 A1 und DE 196 18 032 A1 angegebenen Verfahren der MALDI-Technik unter Verwendung von Zellulosenitraten haben sich bisher für wasserlösliche Matrices und insbesondere für Oligonukleotide nicht bewährt.

Aber selbst bei Aufbringen sehr kleiner Probeflecke reproduzierbarer Empfindlichkeit ist es ein mühsames Unterfangen, die Koordinaten der Probenflecken im Massenspektrometer allein mit massenspektrometrischen Mitteln ohne weitere Hilfsvorrichtungen genau festzustellen, wenn sie ortsgenau aufgebracht wurden. Gerade für einen hohen Probendurchsatz ist es daher höchst wünschenswert, die Orte der Probenflecken vor der Analyse möglichst genau zu kennen. Nur dann ist ein schnelles und automatisches Arbeiten, das heißt, ein Arbeiten ohne ständige Kontrollmessungen möglich. Besonders vorteilhaft wäre ein Aufbringen der Probenflecke in einem präzisen Raster.

Für einen hohen Probendurchsatz der Analyse ist eine Automatisierbarkeit aller Analysenschritte einschließlich der Vorbereitung der Proben notwendig. Während die Probenvorbereitung in Pipettierautomaten heute schon sehr gut automatisch ablaufen kann, steht die Heterogenität der MALDI-Präparationen mit wasserlöslichen Matrices und das ortsgenau auftragen der Probenflecke einer Automatisierbarkeit der massenspektrometrischen Messung noch stark entgegen.

Aufgabe der Erfindung

Es ist die Aufgabe der Erfindung, einen Probenträger zu finden, der besondere Eigenschaften für eine Automatisierbarkeit der massenspektrometrischen Analyse aufweist. Es sollen die aufpipettierten Tröpfchen der Probenlösung für die MALDI-Präparation von Biomolekülen so eintrocknen, daß die erzeugten Probenflecken eine gute und vor allem reproduzierbare Ionisierungsausbeute des MALDI-Verfahrens ergeben. Die getrockneten Probenflecken sollen auf dem Probenträger in einem präzisen Raster angeordnet sein, auch wenn die Tröpfchen mit einem wenig präzise arbeitenden Pipettenroboter aufgebracht werden. Es sollen Verfahren zur günstigen Herstellung solcher Probenträger und zum Beladen der Platten mit Proben gefunden werden.

Erfindungsgedanke

Es ist der Grundgedanke der Erfindung, die Probenträger an ihrer Oberfläche stark flüssigkeitsabweisend für die Probenlösung zu machen, für wäßrige Lösungen also stark hydrophob. Wird auf diese Oberfläche ein Probentropfen aufgebracht, das Analyt und Matrix gelöst enthält, so ergibt sich überraschend ein völlig anderes Kristallisationsverhalten im Tröpfchen, als von bisherigen Präparationen gewohnt. Der auf der hydrophoben Oberfläche ohne erkennbare Benetzung der Oberfläche aufsitzende Tropfen zieht sich beim Eintrocknen stark zusammen, eventuell im Inneren gebildete Kriställchen werden dabei durch die Kraft der Oberflächenspannung auf ein minimales Volumen zusammengeschoben. Im letzten Moment des Eintrocknens findet, wie unter dem Mikroskop zu beobachten ist, eine ruckartige Auskristallisation statt, anscheinend mit einem Füllen der Lücken zwischen den schon gebildeten Kriställchen; es entsteht dabei ein monolithischer Brocken mit einem mikrokristallinen Gefüge im Zentrum des Bereichs, den das Tröpfchen eingenommen hatte.

Dieser monolithische Brocken zeigt überraschenderweise eine sehr gute und von Brocken zu Brocken reproduzierbare Ionisierung der eingebrachten Biomoleküle, mindestens gleich gut wie die mit Mühe gesuchten günstigsten Stellen der bisherigen Präparationen. Wahrscheinlich sind die Biomoleküle in einer für den Desorptions- und Ionisationsprozeß sehr günstigen Lage an den Korngrenzen der mikrokristallinen Gefügestruktur eingebettet.

Aus einem Tröpfchen von 500 Nanoliter Volumen, das ei-

nen Durchmesser von einem Millimeter hat, wird ein kleiner, flacher Block von etwa 200 Mikrometer Durchmesser. Dieser Durchmesser entspricht etwa dem der üblicherweise benutzten Fokusflächen des Laserlichtstrahles. Der monolithische Brocken ist auf der hydrophoben Unterlage festgeklebt, jedoch ist diese Bindung nicht sehr fest. Die eingesetzte Probenmenge kann ohne Einbußen an Signal stark reduziert werden. Eine klassische Präparation auf hydrophilen Flächen würde hier einen Fleckdurchmesser von mindestens einem Millimeter ergeben.

Es ist allerdings schwierig, die Tröpfchen mit einer Pipette auf die hydrophobe Oberfläche aufzupipettieren. Das Tröpfchen hat die Tendenz, an der Pipettenspitze kleben zu bleiben, obwohl die Pipettenspitze in der Regel ebenfalls aus einem hydrophoben Material besteht. Ein gezieltes Ablagern des Tröpfchens auf der Oberfläche gelingt kaum.

Es ist daher ein weiterer Grundgedanke der Erfindung, die Oberfläche des Probenträgers im gewünschten Raster der Probenflecke mit winzig kleinen, benetzungsfreundlichen (hydrophilen) Ankerbereichen für die Probentropfen zu versehen. Der Durchmesser dieser Ankerbereiche soll etwa ein Zehntel des Durchmessers der aufpipettierten Tröpfchen messen, ein günstiger Bereich liegt zwischen einem Viertel und einem Zwanzigstel des Durchmessers der aufzubringenden Probentropfen. Die aufpipettierten Tröpfchen mit gelösten Analytmolekülen hängen sich an diese winzigen Ankerbereiche an. Die Pipette läßt sich abheben, ohne das Tröpfchen wieder mitzunehmen. Selbst bei leicht seitlich verrutschtem Aufbringen der Pipetten steht das Tröpfchen nach dem Lösen von der Pipette als Kugel exakt über dem hydrophilen Ankerbereich und trocknet dort zu dem monolithischen Mikrokristallkonglomerat ein. Es muß dabei nur durch leichtes Aufpressen der Tröpfchen eine Überlappung der aufgetragenen Tröpfchen mit den hydrophilen Ankerbereichen gegeben sein. Die hydrophilen Ankerbereiche sollten kleiner sein, als es dem Durchmesser der schließlich gebildeten Kristallkonglomerate entspricht. Es ist ein weiterer Vorteil dieser hydrophilen Ankerbereiche, daß dort die Kristallkonglomerate recht fest an die Oberfläche des Probenträgers binden.

Insgesamt wird durch die reproduzierbare Ionenausbeute und hohe Empfindlichkeit, durch die Ortspräzision der Probenaufbringung und durch die feststehenden Probenflecke eine Automatisierbarkeit der Analyse erreicht.

Beschreibung der Bilder

Fig. 1 zeigt eine Folge a, b und c von schematischen Darstellungen zum Aufbringen der Probentropfen (3) auf den Probenträger (1) aus den Pipettenspitzen (4) einer Vielfachpipette (5) mit nachfolgendem Eintrocknen.

- (a) Die Pipetten haben die Lösungströpfchen (3) aus ihrer Spitze (4) ausgedrückt, die Tröpfchen (3) sind zwischen Pipettenspitzen (4) und Probenträger (1) platziert. Dadurch erreichen die Tröpfchen ihre hydrophilen Ankerbereiche (2), auch wenn die Pipettenspitzen (4) nicht genau über dem Ankerbereich (2) stehen, und benetzen dort den Probenträger (1).
- (b) Die Pipettenspitzen (4) sind abgehoben, die Tröpfchen (3) haben die Form einer Kugel angenommen und stehen genau über ihren hydrophilen Ankerbereichen (2).
- (c) Die Probentropfen sind eingetrocknet und hinterlassen kleine, monolithische Blöcke (6) genauer Ortsausrichtung mit mikrokristallinem Gefüge auf dem Probenträger (1).

Es soll hier unter einer "hydrophoben" Oberfläche eine benetzungsfeindliche und flüssigkeitsabweisende Oberfläche für die benutzte Probenflüssigkeit verstanden werden, auch wenn es sich dabei (ausnahmsweise) nicht um eine wäßrige Probenlösung handeln sollte. Im Falle einer öligen Probenlösung soll es sich also entsprechend um eine lipophobe Oberfläche handeln. In der Regel lösen sich jedoch die Biomoleküle am besten in Wasser, manchmal unter Zugabe von organischen, wasserlöslichen Lösungsmitteln.

Entsprechend soll unter einer "hydrophilen" Fläche eine benetzungsfreundliche Fläche für die Art der benutzten Probenflüssigkeit gemeint sein, auch wenn es sich dabei nicht um eine wäßrige Lösung handeln sollte.

Die Hydrophobizität kann im Prinzip aus dem Anstellwinkel ermittelt werden, den die Flüssigkeit unter normierten Bedingungen am Rande der Benetzungsfläche mit der festen Oberfläche ausbildet. Für Tröpfchen auf einer stark hydrophoben Oberfläche gibt es aber den Fall, daß sich überhaupt keine Benetzungsfläche ausbildet und es daher auch keinen Anstellwinkel gibt, wie es zum Beispiel für Quecksilbertropfen auf einer Glas- oder Holzplatte zu finden ist.

Die Oberflächen bisher verwendeter metallischer Probenträger sind in der Regel von Natur aus leicht hydrophil gegenüber den wäßrigen Probenlösungen, ein Probentropfen fließt normalerweise etwas auseinander. Die Hydrophilie wird durch die Hydroxygruppen erzeugt, die sich unter der Einwirkung von feuchter Luft auf jedem Metall (selbst auf Edelmetallen) bilden.

Um hydrophobe Oberflächen der Probenträger zu erhalten, kann die ganze Probenträger aus einem hydrophoben Material gefertigt werden, beispielsweise aus Teflon®, das übrigens sowohl hydrophob wie auch lipophob ist. Es ist aber dann dafür zu sorgen, daß die Oberfläche (beispielsweise durch Einlagerung von Graphit) elektrisch leitend wird, da der MALDI-Prozeß für die gleichmäßige Beschleunigung der gebildeten Ionen einerseits ein homogenes elektrisches Feld und andererseits eine Ableitung von Ladungen braucht, deren Polarität zu der der gebildeten Ionen entgegengesetzt ist. Auch eine reine Graphitoberfläche ist sehr hydrophob.

Es ist aus Gründen einfacher Herstellung durchaus zweckmäßig, bei Probenträgern aus Metall oder metallisiertem Kunststoff zu bleiben, jedoch die Oberfläche hydrophob zu machen. Das kann beispielsweise durch einen hauchdünnen, hydrophoben Lack geschehen, oder aber durch Aufkleben einer dünnen, hydrophoben Folie, beispielsweise aus Teflon®. Noch zweckmäßiger ist es aber, die Metalloberfläche durch eine monomolekulare, chemische Veränderung hydrophob zu machen, da dann eine gewisse elektrische Leitfähigkeit, wenn auch hochohmig, erhalten bleibt.

Eine solche Hydrophobisierung einer Metalloberfläche ist an sich bekannt. Dazu werden in der Regel längere Alkanketten (beispielsweise lineare C₁₈-Ketten) über eine Schwefelbrücke kovalent an die Atome der Metalloberfläche gebunden. Diese Bindung ist außerordentlich fest, sie kann mit normalen Mitteln nicht abgewaschen werden. Sie hält einer jahrelangen Bewitterung stand. Noch hydrophobere Oberflächen werden erhalten, wenn die Wasserstoffatome an den Enden der Alkanketten durch Fluoratomer ersetzt werden. Es gibt jedoch viele andere, äquivalente Methoden der Hydrophobisierung, zum Beispiel unter Verwendung von Silikonen, Alkylchlorosilanen oder zinnorganischen Verbindungen.

Der Vorteil einer so präparierten Oberfläche liegt auch darin, daß Metall- und Alkaliionen nicht mehr durch die in

der Regel sauren Matrixlösungen von der Metalloberfläche abgelöst werden und sich beim MALDI-Prozeß als Addukte an die Biomoleküle anlagern können.

Die Herstellung einer dichten Schicht von solchen Alkanketten auf der Metalloberfläche ist im Prinzip sehr einfach. Es werden dazu die entsprechenden Alkanthiole (Alkanhydrogensulfide) zunächst im Methanol gelöst. Die Metallplatten werden dann senkrecht in ein Wasserbad getaucht. Gibt man nun einen Tropfen der methanolischen Lösung der Alkanthiole ins Wasser, so sammeln sich die Alkanthiole in geordneter Formation an der Oberfläche des Wassers. Alle Moleküle sind in sehr enger Anordnung parallel ausgerichtet. Die hydrophoben Alkanenden befinden sich an der Oberfläche des Wasserbades, die hydrophilen Thiolgruppen weisen ins Innere des Wassers. Zieht man nun die Metallplatte vorsichtig aus dem Wasser heraus, so wandert die geschlossene Formation der Alkanthiole an die Oberfläche der Metallplatte und geht dort unter Wahrung der parallelen Orientierung eine kovalente Bindung der Einzelmoleküle mit Metallatomen der Oberfläche unter Bildung von Metallthiolaten ein. Die Belegung ist außerordentlich dicht.

Die hydrophilen Ankerbereiche für die Probentropfen können auf vielerlei Weise erzeugt werden. Ein Beispiel ist das Abdecken der gewünschten Ankerbereiche vor der Hydrophobisierung mit einem abwaschbaren oder hydrophilen Lack. Um genügend kleine Punkte zu erhalten, kann der Decklack in Form kleinster Tröpfchen mit einer piezobetriebenen Tröpfchenpipette nach Art der Tintenstrahl-Drucker aufgeschossen werden. Es ist damit eine außerordentlich gute Ortspräzision der Lackpunkte erreichbar. Nach der Hydrophobisierung können die Lackpunkte einfach abgewaschen werden, sofern sie nicht schon als solche genügend gute hydrophile Anker bilden. Die gewaschenen Ankerbereiche können auch mit besonderen Hydrophilisierungsmitteln besonders hydrophil gemacht werden.

Es können solche hydrophilen Lacktröpfchen aber auch nachträglich auf der hydrophoben Oberfläche aufgedruckt werden. Dazu eignen sich besonders amphiphile Substanzen, die auf der hydrophoben Oberfläche binden und eine hydrophile Oberfläche bilden.

Die hydrophilen Ankerbereiche können aber auch in sehr einfacher Weise durch Zerstörung der hydrophoben Schicht erzeugt werden. Das kann durch Aufdrucken (beispielsweise wieder nach Art der Tintenstrahl-Drucker) von chemisch verändernden oder enzymatisch abbauenden Substanzlösungen geschehen, durch Zerstören mit glühenden Brennsitzen, aber auch durch Ablation von Oberflächenmaterial, beispielsweise durch Funkenerosion oder Laserbeschuß.

Bei langer Lagerung können sich die hydrophilen Ankerbereiche leicht mit hydrophoben Molekülen aus der Umgebungsluft belegen. Es kann daher zweckmäßig sein, die hydrophilen Ankerbereiche bereits kurz nach ihrer Herstellung mit einer dünnen Kristallschicht aus der MALDI-Matrixsubstanz zu belegen. Dazu kann die Oberfläche der metallischen Probenträger kurzzeitig in eine verdünnte Lösung der Matrixsubstanz eingetaucht werden. Nach dem Herausheben bleibt in jeder hydrophilen Ankerbereich ein genau dosiertes Tröpfchen zurück. Das Eintrocknen dieser Tröpfchen ergibt die erwünschten Kristallschichten.

Die Probentropfen werden normalerweise mit Pipetten auf den Probenträger eingebracht, wie schematisch in Fig. 1 gezeigt. Für das gleichzeitige Aufbringen vieler Probentropfen aus Mikrotiterplatten werden Vielfachpipetten verwendet, die von Pipettenrobotern in Pipettenautomaten bewegt werden. Es ist daher günstig, Probenträger in der Größe von Mikrotiterplatten zu verwenden und das Raster der hydrophilen Ankerbereiche an das Raster der Mikrotiterplatten anzupassen. Es ist weiterhin günstig, wenn die

Probenträger auch die Form von Mikrotiterplatten haben, da sie dann von den handelsüblichen Pipettenrobotern bearbeitet werden können. Da auf dem Probenträger eine wesentlich höhere Probendichte erreicht werden kann, als es in Mikrotiterplatten möglich ist, kann das Raster auf dem Probenträger viel feiner sein, als es dem Raster der Mikrotiterplatte entspricht. Es kann beispielsweise durch Teilung des Rasters der Mikrotiterplatten erhalten werden. Es können dann auf einen Probenträger die Proben aus mehreren Mikrotiterplatten aufgebracht werden. Das Grundraster der Ur-Mikrotiterplatte besteht aus 96 kleinen Gefäßen im Raster von 9 Millimetern in einer Anordnung von 8 Reihen mal 12 Spalten. Die Mikrotiterplatten sind aber ohne Veränderung ihrer Größe weiterentwickelt worden, moderne Ausführungsformen zeigen 384 oder sogar 1536 Mikrogefäße im Raster von 4,5 und 2,25 Millimetern.

Die horizontale Ortsgenauigkeit für die Positionierung der Vielfachpipetten über dem horizontal liegenden Probenträger ist auf etwa 200 Mikrometer beschränkt. Die vertikale Ortsgenauigkeit kann leicht durch seitliche Auflageflächen der Vielfachpipetten und Anschlagsbolzen auf etwa 50 Mikrometer verbessert werden.

Die Aufgabe der Tröpfchen erfolgt zweckmäßigerweise, wenn sich die Vielfachpipette im Abstand von 500 Mikrometer über dem Probenträger befindet. Es werden etwa 500 Nanoliter der Probenlösung aus jeder Pipettenspitze der Vielfachpipette auf den Probenträger pipettiert, wie schematisch in Fig. 1 gezeigt. Gewöhnlich ist die Menge der Probenlösung in der Pipettenspitze durch ein Gasbläschen abgeschlossen, daher ist im Kanal der Pipettenspitze anschließend keine Lösung mehr vorhanden und die Kontaktkräfte zur hydrophoben Pipettenspitze sind sehr gering.

Die Tröpfchen, die im entspannten Zustand Kugeln mit einem Durchmesser von einem Millimeter Durchmesser bilden, sind jetzt zwischen der Pipettenspitze und dem Probenträger zusammengedrückt, wie aus Fig. 1a ersichtlich. Selbst bei einer horizontalen Fehljustierung der Pipettenspitzen können die Tröpfchen ihren jeweils zugeordneten hydrophilen Ankerbereich erreichen und sich dort festsetzen. Beim Abheben der Vielfachpipette werden die Tröpfchen auf dem Probenträger verbleiben, da sie dort ihre Anker gefunden haben. Sie stellen sich genau über die Ankerbereiche und nehmen ihre ideal runde Gestalt an, wie in Fig. 1b dargestellt.

Beim Eintrocknen hinterlassen die Tröpfchen die Kristallkonglomerate mit den Probenmolekülen exakt auf den hydrophilen Ankerbereichen, wie in Fig. 1c schematisch zu sehen ist. Die brockenförmigen MALDI-Präparate haben daher wie gewünscht eine exakte Positionierung an vorbekannten Stellen, ihre Größe entspricht den Fokusflächen der Laserstrahlen. Sie bieten außerdem eine hohe Ausbeute an Analytionen, und sind somit in idealer Weise für eine automatisch erfolgende Analyse vorbereitet.

Natürlich können die Tröpfchen auch manuell aufgebracht werden, wie es überhaupt viele Verwendungsmöglichkeiten für die hier dargestellten Probenträger gibt, wie es jedem Fachmann auf diesem Gebiet nach diesen Ausführungen einleuchtend sein wird.

Aus Natur und Zielsetzung des Trocknungsvorgangs folgt, daß bestimmte Zusammensetzungen der Probenlösung zu vermeiden sind. So ist eine Beimengung von Tensiden oder Detergenzien schädlich, weil dadurch eine Benetzung der hydrophoben Oberfläche stattfinden kann. Auch eine Beimengung von solchen organischen Lösemitteln, die eine Benetzung hervorrufen, ist zu vermeiden. Auch hier ist es jedem Fachmann nach diesen Ausführungen verständlich, wie er das Verfahren der Probenvorbereitung und des Aufpipettierens vorzunehmen hat, um eine fehlerhafte Pro-

benaufgabe zu vermeiden.

Sowohl hydrophobe wie auch hydrophile Oberflächen können bei langer Lagerung in Umgebungsluft ihre Benetzungseigenschaften durch Belegung der Oberflächen mit Verunreinigungen aus der Luft ändern. Es ist daher zweckmäßig, die gut präparierten Probenträger im Vakuum oder unter Schutzgas zu lagern.

Patentansprüche

1. Probenträger für die massenspektrometrische Analyse von Biomolekülen mit Ionisierung durch matrix-unterstützte Laserdesorption (MALDI) aus Proben, die als Probenlösungen auf eine Fläche des Probenträgers aufgetragen und dort getrocknet werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß diese Fläche gegenüber den Probenlösungen stark flüssigkeitsabweisend (hydrophob) ist.
2. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich auf der hydrophoben Fläche winzige benetzungsfreundliche (hydrophile) Ankerbereiche für die als Tröpfchen aufzubringenden Probenlösungen befinden.
3. Probenträger nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophilen Ankerbereiche einen Durchmesser haben, der etwa zwischen einem Viertel und einem Zwanzigstel des Durchmessers der aufzubringenden Probentröpfchen liegt.
4. Probenträger nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophilen Ankerbereiche ein Raster bilden, das dem Grundraster einer Mikrotiterplatte (9 Millimeter) oder einem daraus durch Teilung entstandenen feineren Raster entspricht.
5. Probenträger nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß er Größe und Form einer Mikrotiterplatte hat.
6. Probenträger nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß er aus einem hydrophoben Grundmaterial besteht.
7. Verfahren zur Herstellung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenträger aus elektrisch leitfähigem Material hergestellt, daß danach die Oberfläche hydrophob gemacht wird und daß dann die hydrophilen Ankerbereiche erzeugt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydrophobie durch eine chemische Veränderung der Oberfläche, durch einen lackartigen Film, durch Aufbringen eines Polymers oder durch eine aufgeklebte dünne Folie erzeugt wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophilen Ankerbereiche durch Aufdrucken erzeugt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die hydrophilen Ankerbereiche durch Zerstören der Hydrophobie der Oberfläche erzeugt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydrophobie der Oberfläche in den Ankerbereichen durch chemischen oder enzymatischen Abbau, durch Brennstempel, Funkenerosion oder Laserablation zerstört wird.
12. Verfahren zur Herstellung eines Probenträgers nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenträger aus elektrisch leitfähigem Material hergestellt, daß danach die später hydrophilen Ankerbereiche durch Aufdrucken eines abwaschbaren oder bereits hydrophilen Decklackes vor-

Hydrophobisierung der Oberfläche erzeugt und daß dann die restliche Oberfläche hydrophob gemacht wird.

13. Verfahren zum Aufbringen von Probenlösungs-
tröpfchen auf die horizontale Oberfläche eines Proben- 5
trägers nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch ge-
kennzeichnet, daß ein Probenlösungströpfchen mit ei-
ner hydrophoben Pipettenspitze aufgebracht wird, die
sich in einem so geringen Abstand über der Oberfläche
des Probenträgers befindet, daß das Probenlösungs- 10
tröpfchen zwischen Pipettenspitze und Probenträger
plattgedrückt wird und so auch bei auch leichter verti-
kalen Fehljustierung der Pipettenspitze den zugeordne-
ten hydrophilen Ankerbereich berührt.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekenn- 15
zeichnet, daß mit einer Vielfachpipette viele Probenlö-
sungströpfchen gleichzeitig auf die Oberfläche der Pro-
benträger aufgetragen werden.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

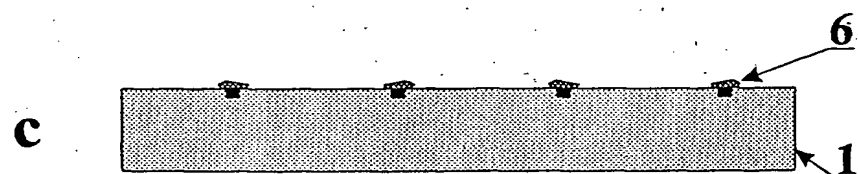
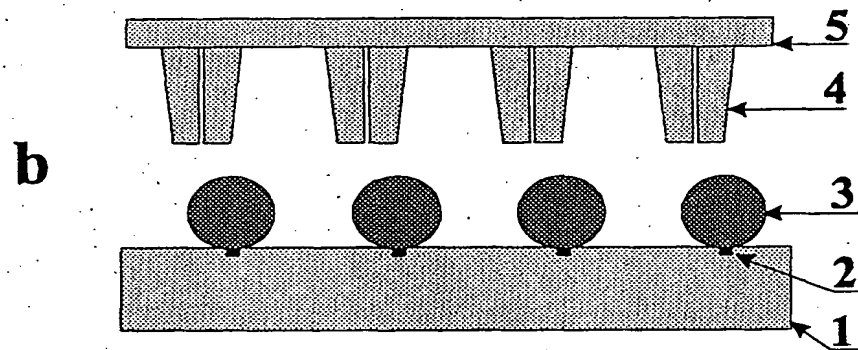
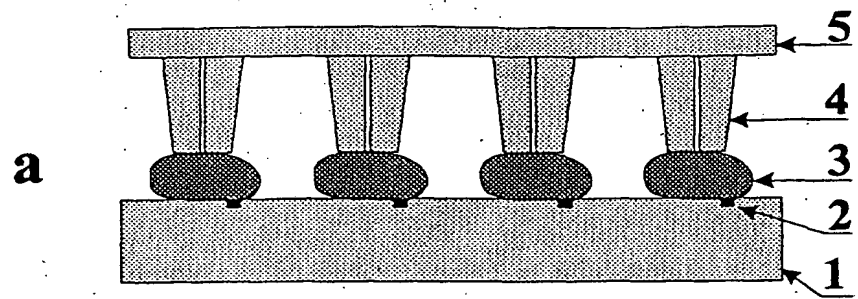
50

55

60

65

- Leerseite -



Figur 1